

無題

1/7/5

DIALOG(R)File 350:Derwent WPIX

(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

012510578

WPI Acc No: 1999-316684/199927

Measurement of antigen, antibody - comprises correcting measured value of captured antigen and antibody corresponding to residual amount of solid phase carrier left in reaction system

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM CORP (MITU )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 11108926	A	19990423	JP 97271697	A	19971003	199927 B
JP 3681873	B2	20050810	JP 97271697	A	19971003	200554

Priority Applications (No Type Date): JP 97271697 A 19971003

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

JP 11108926	A	2	G01N-033/543	
-------------	---	---	--------------	--

JP 3681873	B2	28	G01N-033/543	Previous Publ. patent JP 11108926
------------	----	----	--------------	-----------------------------------

Abstract (Basic): JP 11108926-A

NOVELTY - The antigen and antibody is captured by a solid phase carrier left inside a reaction system. The solid phase carrier is separated from the reaction system by B/F isolation method and the material is measured. The measured value of captured material is corrected corresponding to residual amount of solid phase carrier left in the reaction system after washing process.

USE - For radioimmunoassay, enzyme immunoassay in laboratory examination.

ADVANTAGE - Correction of the measured value results in improvement of reproducibility and accuracy.

Dwg. 0/0

Derwent Class: B04; D16; J04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/543

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-108926

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月23日

(51) Int. Cl. "

G01N 33/543

識別記号

501

541

F I

G01N 33/543

501

L

501

F

541

A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全15頁)

(21) 出願番号

特願平9-271697

(22) 出願日

平成9年(1997)10月3日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 須川 聡

神奈川県横浜市青葉区鵜志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 物質の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 固相担体を用い洗浄工程を有する物質の測定方法において、B/F分離後の固相担体の残存量のばらつきに起因する測定結果のばらつきを補正してその測定再現性を改善し、測定精度をさらに向上させた測定方法を提供する。

【解決手段】 抗原、抗体等の測定対象物質を粒子状の固相担体へ捕捉させ、次いで固相担体を含む反応系を洗浄してB/F分離を行い、その後固相担体に捕捉された測定対象物質を標識体等を用いて測定する際に、洗浄工程後の固相担体の残存量を測定し、前記測定対象物質の測定値をその残存量で除することにより補正する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 測定対象物質を粒子状の固相担体へ捕捉させる捕捉反応を行う反応工程と、前記固相担体を含む反応系を洗浄して B/F 分離を行う洗浄工程と、固相担体に捕捉された前記物質を測定する測定工程とを含む物質の測定方法において、

前記洗浄工程後の固相担体の残存量を指標として前記測定工程における測定値を補正することを特徴とする測定方法。

【請求項 2】 前記測定対象物質が抗原又は抗体である、請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 3】 前記固相担体が平均粒径 0.1 ~ 10  $\mu$ m の微粒子である、請求項 1 又は 2 記載の測定方法。

【請求項 4】 前記残存量が、前記固相担体の粒子数を光学的に測定して求められるものであることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 5】 (a) 測定対象物質を、前記物質に特異的に結合しうる物質を担持させた不溶性磁性粒子からなる固相担体と反応容器の液体媒体中で反応させて、前記測定対象物質を前記不溶性磁性粒子へ捕捉させる反応工程、(b) 工程 (a) における反応後の不溶性磁性粒子を、磁場の作用により反応容器壁に付着させ、洗浄操作により該液体媒体を除去する洗浄工程、(c) 前記測定対象物質と同じ特異性を有する物質を担持させた不溶性蛍光色素標識粒子と、工程 (b) における反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを、液体媒体中で反応させる工程、(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、洗浄操作により該液体媒体及び未反応の不溶性蛍光色素標識粒子を除去する洗浄工程、及び (e) 工程 (d) における反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子と反応した不溶性蛍光色素標識粒子の蛍光強度を測定することにより測定対象物質を測定する測定工程、

を含む物質の測定方法において、前記工程 (b) 及び/又は (d) における洗浄操作後の不溶性磁性粒子の残存量を指標として前記工程 (e) における測定値を補正することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、測定対象物質を粒子状の固相担体へ捕捉させる捕捉反応を行う反応工程と、前記固相担体を含む反応系を洗浄して B/F 分離を行う洗浄工程と、固相担体に捕捉された前記物質を測定する測定工程とを含む物質の測定方法において、洗浄工程を経た後の固相担体の残存量のばらつきに依存する測定値のばらつきを補正し、測定再現性を改善する方法に関する。特に、医療診断における臨床検査方法等に用いられる測定精度の向上した測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 臨床検査分野における免疫測定法には、放射性同位体 (R I)、酵素、発光物質、蛍光物質などを各々標識物質として結合させた抗体または抗原を用いるラジオイムノアッセイ (以下、「R I A」と略記する)、エンザイムイムノアッセイ (以下、「E I A」と略記する)、ケミルミネッセンスイムノアッセイ (以下、「C L I A」と略記する)、フローッセンスイムノアッセイ (以下、「F I A」と略記する) に分類される。また、ラテックス等の不溶性担体粒子に担持された抗体または抗原と、それに対応する抗原または抗体とを反応させ、その反応に伴う反応混合物の透過光の変化から抗原抗体反応の速度を測定するラテックスイムノアッセイ (以下、「L P I A」と略記する) が知られている。

【0003】 これらの測定方法は、未反応の試料や標識物質の洗浄を行わずに直接測定するホモジニアスアッセイと、洗浄によって未反応の試料や過剰の標識物質を除去した後に測定を行うヘテロジニアスアッセイの 2 種類に大別される。これらのうち、後者のヘテロジニアスアッセイでは、目的物と不要物の洗浄分離 (B/F 分離) を行うために固相担体が用いられるが、固相担体がラテックス微粒子のように可動である場合は、B/F 分離工程後の固相担体の残存量 (回収量) にばらつきがみられ、測定値の再現性不良の原因の一つとなっていた。例えば、不溶性担体として一次抗体または抗原を磁性粒子に結合したものをを用い、磁石を利用して磁性粒子を捕集して洗浄操作等を行う方法があるが、B/F 分離を行うための洗浄操作中に、磁力により捕集された磁性粒子の一部が流出し、洗浄工程後の磁性粒子の回収量 (残存量) にばらつきがみられ、測定値の再現性不良の原因の一つとなっていた。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上述したようなヘテロジニアスアッセイ等の、固相担体を用い洗浄操作を行う物質の測定方法において、B/F 分離のための洗浄操作後の固相担体の回収量のばらつきに起因する測定結果のばらつきを補正してその測定再現性を改善し、測定精度をさらに向上させた測定方法を提供することを課題とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明の方法は、測定対象物質を粒子状の固相担体へ捕捉させる捕捉反応を行う反応工程と、前記固相担体を含む反応系を洗浄して B/F 分離を行う洗浄工程と、固相担体に捕捉された前記物質を測定する測定工程とを含む物質の測定方法において、前記洗浄工程後の固相担体の残存量を指標として前記測定工程における測定値を補正することを特徴とする測定方法である。

【0006】 また、本発明の好ましい方法は、(a) 測定対象物質を、前記物質に特異的に結合しうる物質を担

持させた不溶性磁性粒子からなる固相担体と反応容器の液体媒体中で反応させて、前記測定対象物質を前記不溶性磁性粒子へ捕捉させる反応工程、(b) 工程(a)における反応後の不溶性磁性粒子を、磁場の作用により反応容器壁に付着させ、洗浄操作により該液体媒体を除去する洗浄工程、(c) 前記測定対象物質と同じ特異性を有する物質を担持させた不溶性蛍光色素標識粒子と、工程(b)における反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを、液体媒体中で反応させる工程、(d) 工程

(c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、洗浄操作により該液体媒体及び未反応の不溶性蛍光色素標識粒子を除去する洗浄工程、及び

(e) 工程(d)における反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子と反応した不溶性蛍光色素標識粒子の蛍光強度を測定することにより測定対象物質を測定する測定工程、を含む物質の測定方法において、前記工程(b)及び/又は(d)における洗浄操作後の不溶性磁性粒子の残存量を指標として前記工程(e)における測定値を補正することを特徴とする測定方法である。

【0007】本発明の方法は、微粒子状の固相担体に抗体又は抗原を担持し、ヒト又は動物の体液中の成分を抗原抗体反応を利用して前記担体に結合させ、この結合物質を標識体(標識抗体、標識抗原など)によって検出または定量する免疫測定法に代表されるような物質の測定方法において、洗浄工程を経た後の固相担体の粒子数の残存量のばらつきに起因する測定値のばらつきを、該固相担体の粒子数又は濃度を吸光度測定等の方法によってモニターして標識物の測定値を補正することにより、その測定再現性を改善した測定方法である。

【0008】本発明の方法は測定精度が格段に向上したものであり、特に医療診断の分野における臨床検査法等に好適に用いられる。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の方法は、測定対象物質を粒子状の固相担体へ捕捉させる捕捉反応を行う反応工程と、前記固相担体を含む反応系を洗浄してB/F分離を行う洗浄工程と、固相担体に捕捉された前記物質を測定する測定工程とを含むものであれば特に限定されないが、具体的には、検体中に存在する抗体、抗原、核酸などの生物学的活性物質を検出、定量する方法として用いられる免疫測定法、ハイブリダイゼーション法等が挙げられる。

【0010】(1) 測定対象物質

本発明の測定対象物質としては、タンパク質、ペプチド、結合タンパク質、ハプテン、その他の抗原(抗体結合性物質)、それらに対する抗体、核酸などの生物学的活性物質を挙げることができる。

【0011】抗原としては、これに結合する抗体が得られるものであれば特に制限されない。また、抗体としては、上記のような抗原に結合するものであれば制限され

ず、抗体分子全体であっても、フラグメントであってもよい。核酸としては、天然又は合成のDNA、RNAまたはオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0012】(2) 固相担体

本発明に用いる固相担体は、測定対象物質を捕捉するためのものであり、該担体上には、かかる捕捉反応を行うために、通常、前記測定対象物質と特異的に結合しうる物質を固定化(担持)する。

【0013】固相担体の材質は、水又は測定に用いられる溶媒に不溶性であり、測定対象物質と特異的に結合する物質を固定化できるものであれば特に制限されないが、天然ゴムやポリスチレン、ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリル酸エステル、及びポリメタクリル酸エステル等のプラスチック、カオリン、炭素、カーボン、活性炭、ガラス、シリカ、アルミナ、シリカーアルミナ等の無機物、ゼラチン、リポソーム、並びに血球等の天然有機高分子が挙げられる。

【0014】固相担体の形状は、洗浄時に可動の形態を有する粒子状であれば特に限定されず、その粒径も数nm~数mmの範囲で可能であるが、好ましくは平均粒径が0.1~10 $\mu$ mの微粒子である。なお、本発明の方法は、液体による洗浄操作により流動し消失する可能性のある形状の固相担体を用いる場合に、その洗浄操作による消失後の残存量のばらつきを測定し、それに基づいて測定値のばらつきを補正することを特徴とするものであるから、本発明にいう「粒子状」とはかかる洗浄操作により消失する可能性のある微細形状のものすべてを包含するものである。

【0015】本発明において好ましくは、固相担体として不溶性磁性粒子を用いることができる(特開平7-151755号参照)。不溶性磁性粒子は、磁気誘導により容易に磁化され得るものであれば特に制限はされず、例えば、四三酸化鉄( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、三二酸化鉄( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )、各種フェライト、鉄、マンガン、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属や、コバルト、ニッケル、マンガンなどの合金からなる磁性体微粒子、又はこれらの磁性体を内部に含んだポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル、ポリメタクリル酸メチル、ポリカプラミド、ポリエチレンテレフタレートなどの疎水性重合体、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ(2-オキシエチルアクリレート)、ポリ(2-オキシエチルメタクリレート)、ポリ(2,3-ジオキシプロピルアクリレート)、ポリ(2,3-ジオキシプロピルメタクリレート)、ポリエチレングリコールメタクリレートなどの架橋した親水性重合体、もしくはそれぞれのモノマーの2~4種程度の共重合体などのラテックス、ゼラチン、リポソームからなる磁性粒子、又は上記磁性体をラテックス、ゼラチン、リポソームなどの



表面に固定化した磁性粒子などが用いられる。

【0016】固相担体に固定化する前記測定対象物質と特異的に結合しうる物質としては、上述した生物学的活性物質と同様のタンパク質、ペプチド、結合タンパク質、その他の抗原、抗体、核酸などが挙げられる。例えば、前記測定対象物質が抗原である場合にはそれに結合する抗体、抗体である場合にはこれに結合する抗原が挙げられる。また、前記測定対象物質が抗体である場合、これに特異的に結合しうる物質は、この抗体に結合する抗体であってもよい。測定対象物質が核酸である場合、これと特異的に結合しうる物質は、その核酸の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有する核酸である。

【0017】前記測定対象物質が抗原であり、該抗原を測定する免疫測定法を行う場合は、固相担体に固定化する抗体として、好ましくはIgGが用いられるが、ペプシン、パパインなどの消化酵素あるいはジチオスレイトール、メルカプトエタノールなどの還元剤を用いて、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fabなどの低分子化したものを用いてもよい。また、IgGだけでなくIgMあるいはこれをIgGと同様の処理で低分子化したフラグメントを用いてもよい。また、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれも適用できる。モノクローナル抗体を用いるときは、B型肝炎ウィルス表面抗原のように繰り返し構造を持つタンパク質や、CA19-9抗原のように分子内にエпитープを複数持つ抗原に対してはモノクローナル抗体は1種類以上で使用する。また、認識エпитープの異なるものを2種類以上組み合わせても使用できる。

【0018】これらの物質を固相担体へ固定化する方法としては、物理的吸着法や、共有結合法、イオン結合法といった化学的に担持させる方法などが用いられる。物理的吸着法としては、担体粒子に抗体又は抗原を直接固定化する方法、アルブミンなどの他のタンパク質に化学的に結合させてから吸着させて固定化する方法などが挙げられる。

【0019】化学的に担持させる方法としては、担体表面に存在するアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、ヒドロキシル基、アルデヒド基、エポキシ基などを化学的に修飾することにより抗体、抗原等の分子と結合させることができる官能基を利用して、直接担体上に固定化する方法、担体と抗体、抗原等の分子との間にスペーサー分子（カルボジイミド化合物など）を化学結合で導入して固定化する方法、アルブミンなどの他のタンパク質に抗体、抗原等を結合させた後、そのタンパク質を担体に化学結合させる方法などが挙げられる。

#### 【0020】(3) 反応工程

本発明においては、このようにして得られる固相担体を測定対象物質と反応させ、該担体上に固定化された測定対象物質と特異的に結合する物質を介して、該測定対象物質を固相担体へ捕捉させる。反応は、好ましくは反応

容器の液体媒体中で混合することにより行う。免疫測定法の場合はpH5~10、好ましくはpH7~9程度で反応を行う。目的のpHを維持するために、通常、緩衝液が用いられ、例えばリン酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等が例示されるが、これらに限られない。

#### 【0021】(4) 洗浄工程

前記捕捉反応の後、測定対象物質を捕捉した固相担体を含む反応系を洗浄して、未反応の体液成分や未反応の標識体等の物質を除去するB/F分離を行う。

【0022】未反応の物質を固相担体から洗浄・分離除去する方法としては、遠心分離、フィルターによる濾過、磁場による磁性分離などがある。例えば、固相担体を遠心分離等により集めて未反応物を含む液体媒体（上清）を吸引除去する、あるいは必要に応じてさらに固相担体を適当な洗浄液に懸濁させ、攪拌した後遠心分離等により分離して洗浄液のみをまた吸引除去し、この操作を数回繰り返す、等の方法をとることができる。また、磁性分離としては、固相担体として不溶性磁性粒子を用い、不溶性磁性粒子を含む反応容器に磁場を作用させ、磁性粒子を反応容器壁に付着させて集めた後反応液（上清）を除去し、さらに必要に応じて適当な洗浄液を加え、同様に磁場を作用させた後上清を除去する操作を繰り返すことにより行われる。

#### 【0023】(5) 測定工程

前記洗浄工程の後、固相担体に捕捉された測定対象物質を測定する。測定は、通常のイムノアッセイと同様に行えばよい。例えば、標識物質が化学発光物質または蛍光色素であれば、標識物質が発する発光または蛍光を、標識物質が酵素であれば、この酵素活性を測定することにより、測定対象物質を測定することができる。また、標識物質がラジオアイソトープ（放射性同位体）である場合には、標識物質の放射活性を測定すればよい。

【0024】(6) 不溶性磁性粒子を用いた測定方法  
本発明では、固相担体として前述した不溶性磁性粒子を用いる場合、標識物質として測定対象物質と同じ特異性を有する物質を固定化させた不溶性蛍光色素標識粒子を用い、競合法に基づいて測定する方法をとることもできる。その方法は以下の工程を含むものである。

(a) 測定対象物質を、前記物質に特異的に結合しうる物質を担持させた不溶性磁性粒子からなる固相担体と反応容器の液体媒体中で反応させて、前記測定対象物質を前記不溶性磁性粒子へ捕捉させる反応工程。

(b) 工程(a)における反応後の不溶性磁性粒子を、磁場の作用により反応容器壁に付着させ、洗浄操作により該液体媒体を除去する洗浄工程。

(c) 前記測定対象物質と同じ特異性を有する物質を担持させた不溶性蛍光色素標識粒子と、工程(b)における反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子とを、液体媒体中で反応させる工程。

10

20

30

40

50

(d) 工程 (c) の該不溶性磁性粒子を磁場の作用により反応容器壁に付着させ、洗浄操作により該液体媒体及び未反応の不溶性蛍光色素標識粒子を除去する洗浄工程。

(e) 工程 (d) における反応容器壁に付着した該不溶性磁性粒子と反応した不溶性蛍光色素標識粒子の蛍光強度を測定することにより測定対象物質を測定する測定工程。

【0025】不溶性蛍光色素標識粒子に用いる標識色素としては、蛍光色素であればいずれも使用できる。例えば、ユーロピウム (Eu)、テルビウム (Tb)、サマリウム (Sm) などの希土類キレートや、フィコシアニン、フィコエリスリンなどのフィコビリプロテイン、フルオレッセイン、テトラメチルローダミン、テキサスレッド、4-メチルウンベリフェリン、7-アミノ-4-メチルクマリンなどが用いられる。

【0026】色素標識を行う不溶性担体粒子の材質としては、前記不溶性磁性粒子で述べたものと同様に、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル等の疎水性重合体、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸系樹脂等の親水性重合体、またはそれぞれのモノマーの共重合体などのラテックス、ゼラチン、リポソームのほか、赤血球のような生体成分、金コロイドのような金属コロイド粒子等が用いられる。

【0027】かかる不溶性担体粒子に蛍光色素を担持させる方法としては、特開平 1 5 1 7 5 5 公報に記載されているように、例えば粒子表面の官能基を利用して蛍光色素を化学的に結合させる方法、粒子を重合して合成する際に色素を加えて粒子内部に封じ込める方法、粒子内部又は表面に物理的に吸着、封入させる方法、あらかじめタンパク質、ペプチドなどと物理的又は化学的に色素を結合させておいてからそのタンパク質、ペプチドを粒子に固定化する方法などがある。

【0028】こうして得られる蛍光粒子には、測定しようとする生物学的活性物質と同じ特異性を有する抗原又は抗体、核酸等が前述のとおり物理的又は化学的に固定化される。

【0029】なお、本発明における「特異性を有する」とは、測定しようとする物質が抗原である場合、前述した抗原と生物学的あるいは生理学的に同一なものとして生体に非自己として認識され、抗体の産生を導く物質全般を指す。測定しようとする物質が抗体である場合は、かかる抗体の免疫グロブリンクラスと反応するもの、すなわち IgG、IgA、IgM、IgD、IgE もしくはそれらの抗体軽鎖部分に対する抗体、プロテイン A 又は補体成分の一種である C1q 等のように、ある種の抗体分子の特徴を選択的に認識して結合する能力を有する物質をいう。

【0030】不溶性磁性粒子を用いる上記方法において

は、固相担体 (不溶性磁性粒子) に試料中の測定対象物質を捕捉させた後に、該測定対象物質と同じ特異性を有する物質が担持された不溶性蛍光色素標識粒子を加えて同様に前記不溶性磁性粒子に捕捉・結合させる。その際、不溶性磁性粒子に既に捕捉されている測定対象物質は、不溶性磁性粒子上に固定化された物質と不溶性蛍光色素標識粒子とが結合するのを阻害する。よって、固相担体に捕捉される不溶性蛍光色素標識粒子の量は試料中の測定対象物質の量に依存することから、蛍光色素を定量することにより間接的に測定対象物質を定量することができる。

【0031】捕捉反応後、固相担体を洗浄して B/F 分離を行ったのち、得られた固相担体に捕捉された不溶性蛍光色素標識粒子の量を蛍光色素の固有の励起光を照射して放出される蛍光強度を計測することにより測定する。例えば、Eu キレートを標識色素とした場合、励起光は 300 ~ 380 nm、又は 240 ~ 270 nm の紫外光であり、蛍光は 600 ~ 630 nm (615 nm に極大値を有する) である。

【0032】(7) 補正

本発明においては、洗浄工程後の固相担体の残存量を指標として前記測定工程で得られた測定値を補正する。

【0033】固相担体の残存量は、洗浄前後の固相担体の粒子数又は濃度を測定することによって算出することができる。固相担体の粒子数又は濃度を測定する方法としては、固相担体がラテックス粒子の場合は、透過光測定、散乱光測定等の光学的方法を採用するのが好ましい。その場合、好ましくは 300 nm ~ 1100 nm の波長光が用いられる。

【0034】固相担体の残存量を指標として測定値を補正する方法としては、例えば、測定結果のカウント値を固相担体の残存量で除する方法が挙げられる。また、測定結果のカウント値を固相担体の残存量で除し、更に一定値を乗じてよい。これによって、固相担体の洗浄による残存量のばらつきに左右されない測定結果を得ることが可能となる。

【0035】測定対象物質を定量する場合は、あらかじめ濃度既知品又は基準品を試料として測定を行い、得られた定量値を試料の濃度に対して図示して検量線を求める、それを用いて濃度未知試料の定量値から濃度を求めることができる。

【0036】尚、上記で補正のために乗ずる一定値は任意の数でよく、例えば、残存量の平均値や平均値付近の切りのいい数値等が挙げられる。但し、測定対象物質 (濃度未知試料) の蛍光カウント補正時および検量線作成のための蛍光カウント補正時に、同じ数値を用いる必要がある。

【0037】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。

【0038】

【実施例 1】＜T R - F I A 法による遊離サイロキシン (F T 4) の測定＞

(1) 試薬の調製

①磁性ラテックス試薬の調製

マウス抗 T 4 モノクローナル抗体を、公知の方法に従って、カルボジイミドによって磁性ラテックス粒子 (材質: ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、平均粒径:  $0.7 \mu\text{m}$ ) 上のカルボキシル基に共有結合させて調製した。

②ユーロピウムラテックスの調製

精製 T 4 を公知の方法に従って、カルボジイミドによってユーロピウムラテックス (材質: ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、平均粒径:  $0.4 \mu\text{m}$ ) 上のカルボキシル基に共有結合させて調製した。

③反応バッファの調製

トリス (Tris) 緩衝液:  $0.2 \text{ M}$  (pH 7.0)、ゼラチン (Gelatin):  $0.2\%$ 、 $\text{NaN}_3$ :  $0.1\%$  を含む溶液を調製した。

【0039】(2) 測定方法

抗 T 4 抗体感作磁性ラテックス粒子  $100 \mu\text{L}$ 、前記反応バッファ  $100 \mu\text{L}$ 、及び下記 F T 4 標準品  $20 \mu\text{L}$  をキュベット中で  $37^\circ\text{C}$  にて 5 分間反応させた後、キュベットを磁石上に 1 分間静置して磁性ラテックス粒子を集め、上清を吸引して洗浄を行った。

【0040】次に、キュベットにトラップされた磁性ラテックス粒子と T 4 感作ユーロピウムラテックス粒子  $100 \mu\text{L}$  および反応バッファ  $100 \mu\text{L}$  を  $37^\circ\text{C}$  にて 10 分間反応させ、同様に磁石上で 1 分間静置させてから上清の吸引洗浄を行った。

【0041】次いで、磁性ラテックス粒子を水中に分散させ、吸光度計で吸光度 ( $540 \text{ nm}$ ) を測定し、同時に蛍光強度計で蛍光強度を測定した。測定は L P I A・A-700 とよばれる全自動 T R - F I A 測定装置 (三菱化学社製) において、下記濃度の F T 4 標準品を用い、それぞれ 10 反復測定を行った。

【0042】(F T 4 標準品)

Cal. A:  $0.00 \text{ ng/dL}$

Cal. B:  $0.27 \text{ ng/dL}$

Cal. C:  $0.67 \text{ ng/dL}$

Cal. D:  $1.60 \text{ ng/dL}$

Cal. E:  $2.83 \text{ ng/dL}$

Cal. F:  $4.70 \text{ ng/dL}$

Cal. G:  $6.47 \text{ ng/dL}$

Cal. H:  $8.57 \text{ ng/dL}$

【0043】(3) 測定結果

蛍光強度計による蛍光カウント値を表 1 に、濃度換算値

を表 2 に、最終 OD 値を表 3 にそれぞれ示す。濃度計算は蛍光カウント値を検量線としてスプライン関数を用いて計算を行った。

【0044】

【表 1】

Test No.	Cal. A	Cal. B	Cal. C	Cal. D	Cal. E	Cal. F	Cal. G	Cal. H
1	18562.9	16343.7	15032.0	11174.9	7502.8	4421.4	3023.4	2570.7
2	19439.9	16455.8	14671.3	11368.5	7604.3	4586.5	3036.4	2593.6
3	18357.4	16696.3	14995.1	11219.4	7784.5	4396.1	3035.6	2536.5
4	18339.4	16263.2	15050.7	10799.0	7470.9	4521.8	3115.8	2532.8
5	18147.8	16432.5	15123.3	11022.3	7327.2	4435.8	3053.0	2602.3
6	18331.0	16452.6	15120.2	11230.7	7392.6	4498.4	3115.7	2573.0
7	18372.0	16872.6	15165.5	11180.3	7550.5	4442.3	3102.0	2584.4
8	18656.5	16777.5	14884.6	11124.8	7186.8	4546.3	3096.6	2577.3
9	18484.7	16741.5	13949.5	11363.5	7650.9	4490.1	3114.6	2520.1
10	18519.1	16934.7	14514.7	11460.1	7452.4	4482.2	2979.9	2590.0
Mean	18521.1	16597.0	14850.7	11194.4	7492.3	4482.1	3067.3	2568.1
SD	353.3	234.9	379.8	189.4	169.7	59.4	48.0	28.3
CV%	1.9	1.4	2.6	1.7	2.3	1.3	1.6	1.1

表 1 蛍光カウント (補正前)

【0045】

【表 2】



表2 濃度 (補正前)

Test No.	Cal. A	Cal. B	Cal. C	Cal. D	Cal. E	Cal. F	Cal. G	Cal. H
1	-0.01	0.31	0.62	1.61	2.83	4.75	6.55	8.44
2	-0.12	0.29	0.72	1.55	2.78	4.61	6.52	8.24
3	0.02	0.25	0.63	1.59	2.71	4.78	6.52	8.74
4	0.02	0.33	0.62	1.71	2.84	4.66	6.36	8.77
5	0.05	0.30	0.60	1.65	2.90	4.74	6.48	8.17
6	0.02	0.29	0.60	1.59	2.87	4.68	6.36	8.42
7	0.02	0.23	0.58	1.60	2.81	4.74	6.39	8.32
8	-0.02	0.24	0.66	1.62	2.96	4.64	6.40	8.38
9	0.00	0.25	0.90	1.56	2.76	4.69	6.36	8.88
10	0.00	0.22	0.76	1.53	2.85	4.70	6.64	8.27
Mean	-0.00	0.27	0.67	1.60	2.83	4.70	6.46	8.46
SD	0.05	0.04	0.10	0.05	0.07	0.05	0.10	0.25
CV%	#####	13.9	14.8	3.2	2.5	1.1	1.5	2.9

(ng/dl.)



表 3 最終OD

(OD540)

Test No.	Cal. A	Cal. B	Cal. C	Cal. D	Cal. E	Cal. F	Cal. G	Cal. H
1	0.7788	0.7826	0.8209	0.8060	0.7955	0.7846	0.7751	0.7879
2	0.8022	0.7822	0.7975	0.8238	0.7921	0.8003	0.7808	0.7899
3	0.8024	0.8101	0.8084	0.8055	0.8158	0.7704	0.7921	0.8012
4	0.8011	0.7966	0.8055	0.7832	0.7953	0.7843	0.7948	0.7974
5	0.7848	0.8002	0.8252	0.7995	0.7966	0.7944	0.7649	0.8094
6	0.7931	0.7982	0.8190	0.7999	0.8034	0.8057	0.7938	0.7968
7	0.7999	0.8125	0.8228	0.8122	0.7984	0.7855	0.7934	0.7918
8	0.8138	0.8014	0.8014	0.8115	0.7606	0.7914	0.8085	0.7789
9	0.8097	0.8160	0.7598	0.8204	0.8161	0.7898	0.7926	0.8057
10	0.8136	0.8225	0.7761	0.8187	0.8026	0.7878	0.7643	0.8118
Mean	0.7999	0.8022	0.8037	0.8081	0.7976	0.7894	0.7860	0.7971
SD	0.0116	0.0134	0.0214	0.0121	0.0154	0.0097	0.0143	0.0103
CV%	1.4	1.7	2.7	1.5	1.9	1.2	1.8	1.3

【0047】表2に示したようにCal. B、Cal. C等の低濃度域では濃度のCV%が10%を超えてしまうことがわかる。このデータを用いて本発明のデータ補正法によってどのようにデータが改善されるかを次に示す。

【0048】(4) データ補正

表1のデータをOD値で除することによって補正し、さらに得られる値を補正後の蛍光カウント値とするために0.7を乗じた。すなわち、

【0049】

【数1】 蛍光カウント ÷ OD 値 × 0.7

【0050】の計算式によって蛍光カウントの補正値を得た。その結果を表4に示す。次に、この蛍光カウント補正値を検量線として上述と同様の方法で濃度計算を行った。その結果を表5に示す。

【0051】

【表4】

表4 蛍光カウント(補正後)

Test No.	Cal. A	Cal. B	Cal. C	Cal. D	Cal. E	Cal. F	Cal. G	Cal. H
1	16684.7	14618.7	12818.1	9705.2	6602.0	3944.7	2730.5	2283.9
2	16963.2	14726.5	12877.6	9660.1	6720.1	4011.7	2722.2	2298.4
3	16014.7	14427.1	12984.4	9750.0	6679.5	3994.4	2682.6	2216.2
4	16024.9	14291.1	13079.4	9651.8	6575.7	4035.8	2744.1	2223.4
5	16186.9	14374.9	12828.8	9650.5	6438.7	3908.7	2783.9	2250.6
6	16179.2	14428.5	12923.3	9828.1	6441.1	3908.3	2747.5	2260.4
7	16077.5	14536.4	12902.1	9635.8	6619.9	3958.8	2736.8	2284.8
8	16047.6	14654.7	13001.3	9596.3	6614.2	4021.3	2681.0	2316.3
9	15980.4	14361.6	12851.6	9695.8	6562.5	3979.6	2750.7	2189.5
10	15933.4	14412.5	13091.5	9798.6	6499.7	3982.6	2729.2	2233.3
Mean	16209.2	14483.2	12935.8	9697.2	6575.3	3974.6	2731.9	2255.7
SD	339.9	143.1	99.2	74.4	93.5	44.3	32.9	40.4
CV%	2.1	1.0	0.8	0.8	1.4	1.1	1.2	1.8

(K count)

表 5 濃度 (補正後)

Test No.	Cal. A	Cal. B	Cal. C	Cal. D	Cal. E	Cal. F	Cal. G	Cal. H
1	-0.07	0.25	0.71	1.50	2.82	4.73	6.46	8.26
2	-0.11	0.23	0.69	1.61	2.76	4.66	6.48	8.15
3	0.03	0.28	0.66	1.58	2.78	4.68	6.57	8.81
4	0.03	0.31	0.63	1.61	2.83	4.64	6.43	8.75
5	0.00	0.29	0.70	1.61	2.90	4.77	6.32	8.53
6	0.00	0.28	0.67	1.56	2.90	4.77	6.42	8.45
7	0.02	0.26	0.68	1.62	2.81	4.72	6.45	8.25
8	0.02	0.24	0.65	1.63	2.81	4.65	6.58	8.03
9	0.03	0.29	0.70	1.60	2.84	4.69	6.41	9.02
10	0.04	0.28	0.62	1.57	2.87	4.69	6.46	8.67
Mean	-0.00	0.27	0.67	1.60	2.83	4.70	6.46	8.49
SD	0.05	0.03	0.03	0.02	0.05	0.05	0.08	0.32
CV%	#####	9.3	4.6	1.4	1.7	1.0	1.2	3.8

## 【0053】 (5) 考察

補正前のデータ (表 1・表 2) と補正後のデータ (表 4・表 5) を比較してわかるように、本発明のデータ補正処理によって測定値の CV%, 即ち測定再現性が向上し、特に Cal. B、Cal. C での CV% が 10% 以内に入っていることがわかる。

## 【0054】

## 【実施例 2】

<TR-FIA 法による総トリヨードサイロニン (TT 3) の測定>

## (1) 試薬の調製

## 40 ①磁性ラテックス試薬の調製

ヒッジ抗 T 3 モノクローナル抗体を公知の方法に従って、カルボジイミドによって磁性ラテックス粒子 (材質: ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、平均粒径:  $0.7 \mu\text{m}$ ) 上のカルボキシル基に共有結合させて調製した。

## ②ユーロピウムラテックスの調製

精製 T 3 を公知の方法に従って、カルボジイミドによってユーロピウムラテックス (材質: ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、平均粒径:  $0.4 \mu\text{m}$ ) 上のカル

## 50 ポキシル基に共有結合させて調製した。



## ③反応バッファー (1) の調製

バルビタール (Barbital) Na : 120mM (pH 8.6)、ゼラチン : 0.2%、NaN<sub>3</sub> : 0.1%、AN S (8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸) : 1mMを含む溶液を調製した。

## ④反応バッファー (2) の調製

トリス (Tris) 緩衝液 : 0.2M (pH 7.0)、ゼラチン : 0.2%、NaN<sub>3</sub> : 0.1%を含む溶液を調製した。

## 【0055】 (2) 測定

下記TT3標準品20μL、反応バッファー (1) : 100μL、及び抗T3抗体感作磁性ラテックス粒子100μLをキュベット中で37℃・5分間反応させた後、キュベットを磁石上に1分間静置して磁性ラテックス粒子を集め、上清を吸引して洗浄を行った。

【0056】次に、キュベットにトラップされた磁性ラテックス粒子とT3感作ユーロピウムラテックス粒子100μL及び反応バッファー100μLを37℃にて10分間反応させ、同様に磁石上で1分間静置させてから

上清の吸引洗浄を行った。

【0057】最後に磁性ラテックス粒子を水中に分散させ、吸光度計で吸光度を測定し、同時に蛍光強度計で蛍光強度を測定した。測定は実施例1と同様にLPIA・A-700において、下記濃度のTT3標準品を用い、それぞれ10反復測定を行った。

## 【0058】 (TT3標準品)

Cal. A' : 0.00ng/mL

Cal. B' : 0.50ng/mL

10 Cal. C' : 1.00ng/mL

Cal. D' : 1.98ng/mL

Cal. E' : 3.95ng/mL

Cal. F' : 7.90ng/mL

## 【0059】 (3) 測定結果

蛍光カウント値を表6に、濃度換算値を表7に、最終OD値を表8にそれぞれ示す。濃度計算は蛍光カウント値を検量線とし、スプライン関数を用いて計算を行った。

## 【0060】

【表6】

表6 蛍光カウント (補正前)

(K count)

Test No.	Cal. A'	Cal. B'	Cal. C'	Cal. D'	Cal. E'	Cal. F'
1	8190.4	6516.9	4345.3	2090.0	760.3	539.1
2	8583.6	6054.9	4431.6	2249.0	814.6	515.5
3	8384.7	6614.4	4534.6	2185.8	794.3	481.6
4	8402.7	6431.9	4296.6	2245.8	787.3	510.0
5	8434.5	6213.5	4490.4	2210.3	806.7	515.4
6	8527.6	6383.4	4507.1	2259.3	784.4	479.3
7	8862.1	6583.2	4473.5	2375.5	820.7	489.1
8	8605.8	6516.1	4528.3	2291.8	818.7	518.9
9	8551.0	5966.4	4662.7	2342.9	819.7	524.4
10	8249.1	6552.5	4708.6	2278.6	880.1	485.7
Mean	8479.2	6383.3	4497.9	2252.9	808.7	505.9
SD	192.7	228.6	125.9	80.5	31.8	20.6
CV%	2.3	3.6	2.8	3.6	3.9	4.1

## 【0061】

【表7】

表7 濃度 (補正前)

(ng/mL)

Test No.	Cal. A'	Cal. B'	Cal. C'	Cal. D'	Cal. E'	Cal. F'
1	0.07	0.47	1.05	2.09	4.14	5.55
2	-0.02	0.58	1.02	1.98	3.93	5.89
3	0.02	0.44	0.99	2.03	4.00	6.70
4	0.02	0.49	1.06	1.98	4.03	6.00
5	0.01	0.54	1.00	2.01	3.96	5.89
6	-0.01	0.50	1.00	1.98	4.04	82.44
7	-0.09	0.45	1.01	1.90	3.91	6.11
8	-0.03	0.47	0.99	1.95	3.91	5.83
9	-0.02	0.60	0.95	1.92	3.91	5.75
10	0.05	0.46	0.94	1.96	3.71	9.91
Mean	0.00	0.50	1.00	1.98	3.95	14.01
SD	0.04	0.06	0.04	0.05	0.11	24.08
CV%	#####	11.1	3.8	2.8	2.9	171.9

【0062】

【表8】

表8 最終OD

(OD540)

Test No.	Cal. A'	Cal. B'	Cal. C'	Cal. D'	Cal. E'	Cal. F'
1	0.7562	0.7856	0.7464	0.7349	0.7609	0.7690
2	0.7867	0.7440	0.7558	0.7499	0.7727	0.7962
3	0.7645	0.7942	0.7584	0.7598	0.7587	0.7790
4	0.7767	0.7748	0.7535	0.7647	0.7522	0.7815
5	0.7799	0.7653	0.7677	0.7589	0.7866	0.7983
6	0.7757	0.7752	0.7785	0.7679	0.7602	0.7828
7	0.7958	0.7992	0.7724	0.7825	0.7880	0.7788
8	0.7834	0.7911	0.7614	0.7690	0.7734	0.8010
9	0.7872	0.7348	0.7774	0.7716	0.7744	0.7999
10	0.7591	0.7888	0.7817	0.7624	0.7631	0.8197
Mean	0.7765	0.7753	0.7653	0.7622	0.7690	0.7906
SD	0.0130	0.0216	0.0120	0.0129	0.0120	0.0150
CV%	1.7	2.8	1.6	1.7	1.6	1.9

【0063】表7に示したようにCal. B'、Cal. F'では濃度のCV%が10%を超えてしまうことがわかる。このデータを用いて本発明のデータ補正法によってどのようにデータが改善されるかを次に示す。

【0064】(4) データ補正

表6のデータをOD値で除することによって補正し、さらに得られる値を補正後の蛍光カウント値とするために0.7を乗じた。すなわち、

【0065】

【数2】 蛍光カウント ÷ OD 値 × 0.7

【0066】の計算式によって蛍光カウントの補正値を得た。その結果を表9に示す。次に、この蛍光カウント補正値を検量線として上述と同様の方法で濃度計算を行った。その結果を表10に示す。

【0067】

【表9】

表9 蛍光カウント(補正後)

(K count)

Test No.	Cal. A'	Cal. B'	Cal. C'	Cal. D'	Cal. E'	Cal. F'
1	7581.7	5806.8	4075.1	1990.8	699.4	490.7
2	7637.6	5696.8	4104.4	2099.3	738.0	453.2
3	7677.3	5829.8	4185.4	2013.8	732.9	432.8
4	7572.9	5810.9	3991.5	2055.7	732.7	456.8
5	7570.4	5683.3	4094.4	2038.8	717.9	451.9
6	7695.4	5764.1	4052.7	2059.5	722.3	428.6
7	7795.3	5766.0	4054.1	2125.1	729.1	439.6
8	7689.6	5765.7	4163.1	2086.1	741.0	453.5
9	7603.8	5683.9	4198.4	2125.5	741.0	458.9
10	7606.9	5814.8	4216.5	2092.1	807.4	414.7
Mean	7643.1	5762.2	4113.6	2068.7	736.2	448.1
SD	71.6	56.1	74.1	45.2	28.0	20.8
CV%	0.9	1.0	1.8	2.2	3.8	4.6

【0068】

【表10】

表10 濃度(補正後)

(ng/mL)

Test No.	Cal. A'	Cal. B'	Cal. C'	Cal. D'	Cal. E'	Cal. F'
1	0.02	0.49	1.01	2.04	4.11	5.56
2	0.00	0.52	1.00	1.96	3.94	6.27
3	-0.01	0.48	0.98	2.02	3.96	5.43
4	0.02	0.49	1.04	1.99	3.96	6.16
5	0.02	0.52	1.01	2.00	4.03	6.31
6	-0.01	0.50	1.02	1.99	4.01	6.18
7	-0.04	0.50	1.02	1.94	3.98	6.76
8	-0.01	0.50	0.98	1.97	3.93	6.26
9	0.01	0.52	0.97	1.94	3.93	6.11
10	0.01	0.49	0.96	1.96	3.68	5.49
Mean	0.00	0.50	1.00	1.98	3.95	6.05
SD	0.02	0.01	0.03	0.03	0.11	0.43
CV%	#####	2.9	2.6	1.7	2.8	7.0

【0069】(5) 考察

50 補正前のデータ(表6、表7)と補正後のデータ(表

9、表10)を比較してわかるように、本発明のデータ補正処理によって測定値のCV%、即ち測定再現性が向上し、特にCal.B、Cal.FでのCV%が10%以内に入っていることがわかる。

【0070】

【実施例3】

<TR-FIA法による甲状腺刺激ホルモン(TSH)の測定>

(1) 試薬の調製

①磁性ラテックス試薬の調製

マウス抗TSHモノクローナル抗体を公知の方法に従って、カルボジイミドによって磁性ラテックス粒子(材質:ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、平均粒径:1 $\mu$ m)上のカルボキシル基に共有結合して調製した。

②ユーロピウムラテックスの調製

マウス抗TSHモノクローナル抗体を公知の方法に従って、カルボジイミドによってユーロピウムラテックス(材質:ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体、平均粒径:0.1 $\mu$ m)上のカルボキシル基に共有結合して調製した。

③反応バッファの調製

トリス(Tris)緩衝液:0.2M(pH7.0)、ゼラチン:0.2%、NaN<sub>3</sub>:0.1%を含む溶液を調製した。

【0071】(2) 測定方法

下記TSH標準品70 $\mu$ Lと反応バッファ100 $\mu$ L及び抗TSH抗体感作磁性ラテックス粒子100 $\mu$ Lをキュベット中で37℃にて5分間反応させた後、キュベットを磁石上に1分間静置して磁性ラテックス粒子を集め、上清を吸引して洗浄を行った。

【0072】次に、キュベットにトラップされた磁性ラテックス粒子と抗TSH抗体感作ユーロピウムラテックス粒子100 $\mu$ Lおよび反応バッファ100 $\mu$ Lを37℃にて10分間反応させ、同様に磁石上で1分間静置させてから上清の吸引洗浄を行った。

【0073】次いで、磁性ラテックス粒子を水中に分散させ、吸光度計で吸光度を測定し、同時に蛍光強度計で蛍光強度を測定した。測定は実施例1と同様にLPIA-A-700において、下記濃度のTSH標準品を用い、それぞれ10反復測定を行った。

【0074】(TSH標準品)

Cal.1: 0.00 $\mu$ IU/mL

Cal.2: 0.05 $\mu$ IU/mL

Cal.3: 0.1 $\mu$ IU/mL

Cal.4: 0.2 $\mu$ IU/mL

Cal.5: 1.0 $\mu$ IU/mL

Cal.6: 10 $\mu$ IU/mL

Cal.7: 50 $\mu$ IU/mL

Cal.8: 80 $\mu$ IU/mL

【0075】また、濃度計算はTSH標準品を下記のように回帰して計算を行った。

Cal.1~Cal.4: 直線

Cal.4~Cal.6: 放物線(対数)

Cal.6~Cal.8: 放物線(対数)

【0076】(3) 測定結果

蛍光カウント値を表11に、濃度換算値を表12に、最終OD値を表13にそれぞれ示す。

【0077】

10 【表11】

Test No.	(K count)							
	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Cal. 5	Cal. 6	Cal. 7	Cal. 8
1	49.8	80.9	93.0	102.8	391.1	3221.1	12626.3	14553.0
2	40.0	78.8	77.3	95.1	381.3	3271.0	11994.8	15681.3
3	41.4	73.1	80.5	112.7	381.0	3518.6	12652.2	15326.7
4	52.7	75.1	84.4	99.1	351.1	3450.0	12354.4	15533.8
5	55.2	63.1	89.5	120.9	389.8	3492.4	12210.1	15705.2
6	52.6	69.6	80.7	126.7	400.9	3525.6	12541.3	15486.2
7	38.9	78.5	82.1	125.1	397.2	3567.2	12477.1	15721.4
8	41.7	68.7	85.5	110.1	408.7	3510.7	12982.4	15377.4
9	58.6	65.9	84.9	128.6	370.2	3724.0	12691.8	15459.2
Mean	47.9	72.6	84.2	113.5	385.7	3475.6	12503.4	15427.1
SD	7.4	6.2	4.8	12.6	17.4	151.3	289.7	357.3
CV%	15.5	8.5	5.7	11.1	4.5	4.4	2.3	2.3

表11 蛍光カウント(補正前)

50 【0078】



【表 1 2】

表 12 濃度 (補正前)

Test No.	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Cal. 5	Cal. 6	Cal. 7	Cal. 8
1	0.01	0.10	0.14	0.17	1.02	9.31	50.95	68.97
2	-0.02	0.09	0.09	0.14	0.99	9.45	46.30	83.70
3	-0.02	0.08	0.10	0.20	0.99	10.12	51.15	78.60
4	0.01	0.08	0.11	0.16	0.89	9.93	48.89	81.52
5	0.02	0.05	0.13	0.22	1.01	10.05	47.83	84.06
6	0.01	0.07	0.10	0.23	1.05	10.14	50.29	80.83
7	-0.03	0.09	0.10	0.23	1.04	10.25	49.80	84.31
8	-0.02	0.06	0.11	0.19	1.07	10.09	53.80	79.30
9	0.03	0.05	0.11	0.24	0.95	10.68	51.46	80.45
Mean	0.00	0.07	0.11	0.20	1.00	10.00	50.05	80.19
SD	0.02	0.02	0.02	0.04	0.06	0.41	2.19	4.69
CV%	####	24.3	14.4	17.8	5.5	4.1	4.4	5.8

【0079】

【表 1 3】

表 13 最終 OD

Test No.	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Cal. 5	Cal. 6	Cal. 7	Cal. 8
1	0.3111	0.3089	0.3153	0.2935	0.2921	0.3044	0.3150	0.3082
2	0.2975	0.2974	0.3042	0.2746	0.2925	0.3049	0.3055	0.3161
3	0.3021	0.3024	0.2991	0.2964	0.2918	0.3135	0.3258	0.3179
4	0.2943	0.2892	0.2972	0.2907	0.2769	0.3092	0.3145	0.3147
5	0.2958	0.2946	0.3039	0.2921	0.3142	0.3111	0.3130	0.3121
6	0.2919	0.3008	0.2843	0.3021	0.3112	0.3110	0.3120	0.3161
7	0.2972	0.2975	0.3166	0.3033	0.3055	0.3126	0.3089	0.3155
8	0.2979	0.3002	0.3017	0.2833	0.2998	0.3094	0.3161	0.3148
9	0.3055	0.2945	0.2791	0.3161	0.2877	0.3205	0.3135	0.3118
Mean	0.2993	0.2984	0.3002	0.2947	0.2969	0.3107	0.3138	0.3141
SD	0.0060	0.0056	0.0124	0.0120	0.0119	0.0048	0.0056	0.0029
CV%	2.0	1.9	4.1	4.1	4.0	1.5	1.8	0.9

40 【0080】 (4) データ補正

表 1 1 のデータを OD 値で除することによって補正し、さらに得られる値を補正後の蛍光カウント値とするために 0.3 を乗じた。すなわち、

【0081】

【数 3】 蛍光カウント ÷ OD 値 × 0.3

【0082】 の計算式によって蛍光カウントの補正値を得た。その結果を表 1 4 に示す。次に、この蛍光カウント補正値を検量線として上述と同様の方法で濃度計算を行った。その結果を表 1 5 に示す。

50 【0083】

【表 1 4】

表14 蛍光カウント (補正後)

Test No.	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Cal. 5	Cal. 6	Cal. 7	Cal. 8
1	48.0	78.5	88.4	105.1	401.7	3174.5	12024.9	14165.7
2	40.4	79.5	76.2	104.1	391.1	3218.4	11778.9	14882.6
3	41.1	72.5	80.7	114.0	391.7	3367.0	11650.2	14463.6
4	53.7	78.0	85.2	102.3	380.5	3347.3	11784.8	14808.1
5	56.0	64.2	88.3	124.2	372.1	3367.7	11702.9	15096.3
6	54.1	69.4	85.2	125.8	386.5	3400.8	12058.9	14697.3
7	39.2	79.2	77.7	123.7	390.0	3423.3	12117.6	14949.0
8	42.0	68.6	85.0	115.7	409.0	3404.0	12321.1	14654.4
9	57.5	67.1	91.4	122.0	386.1	3485.7	12145.2	14874.1
Mean	48.0	73.0	84.2	115.2	389.9	3354.3	11953.8	14732.3
SD	7.4	5.9	5.1	9.4	10.8	98.6	231.5	280.3
CV%	15.5	8.1	6.0	8.1	2.8	2.9	1.9	1.9

【0 0 8 4】

【表 1 5】

表15 濃度 (補正後)

Test No.	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Cal. 5	Cal. 6	Cal. 7	Cal. 8
1	0.00	0.09	0.12	0.17	1.04	9.48	50.57	72.23
2	-0.02	0.09	0.08	0.17	1.00	9.61	48.62	82.27
3	-0.02	0.07	0.10	0.20	1.01	10.04	47.63	76.17
4	0.02	0.09	0.11	0.16	0.97	9.98	48.67	81.13
5	0.02	0.05	0.12	0.22	0.95	10.04	48.04	85.69
6	0.02	0.06	0.11	0.23	0.99	10.13	50.85	79.48
7	-0.03	0.09	0.09	0.22	1.00	10.20	51.33	83.31
8	-0.02	0.06	0.11	0.20	1.06	10.14	53.04	78.86
9	0.03	0.06	0.13	0.22	0.99	10.37	51.56	82.14
Mean	0.00	0.07	0.11	0.20	1.00	10.00	50.03	80.14
SD	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.28	1.86	4.04
CV%	#####	22.6	14.5	13.2	3.3	2.8	3.7	5.0

(μIU/mL)

40 【0 0 8 5】 (5) 考察本発明のデータ補正処理によってほぼ全領域にわたってCV%の向上が見られた。

【0 0 8 6】

【発明の効果】本発明によれば、固相担体を用い洗浄工程を有する物質の測定方法において、B/F分離後の固相担体の残存量のばらつきに起因する測定結果のばらつきを補正することにより、測定再現性を改善することができる。よって、臨床検査法等の測定精度をさらに向上させることができる。